

Annexin A5: shifting from molecular imaging tool to therapeutic agent in cardiovascular diseases

Citation for published version (APA):

Schutters, K. (2013). *Annexin A5: shifting from molecular imaging tool to therapeutic agent in cardiovascular diseases*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Uitgeverij BOXPress. <https://doi.org/10.26481/dis.20131205ks>

Document status and date:

Published: 01/01/2013

DOI:

[10.26481/dis.20131205ks](https://doi.org/10.26481/dis.20131205ks)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 05 May. 2023

SUMMARY

Multicellular organisms regulate their cell number by a process of cell proliferation and cellular death. From a biological point of view, a cell has mainly two pathways to die: a gen regulated form (apoptosis) and a non-regulated form (necrosis).

In 1992 it was found that cells are able to expose phosphatidylserine (PS) during apoptotic cell death at their cell surface. PS is a negatively charged phospholipid which in healthy cells is mainly located at the inner leaflet of the cell membrane. Therefore, cell surface expressed PS serves as a target for the visualization of apoptotic cell death. To date anxA5, that binds PS with high affinity, is the only protein that has been used to visualize PS expressing cells in patients.

In this thesis the focus was not directed to improve the existing molecular imaging techniques but; I) towards the development of anxA5 as a biomarker in heart failure and; II) towards the development of anxA5 variants as a therapeutic agent in diseases where the balance between apoptosis and phagocytosis is disturbed.

In chapter 2 we measured anxA5 concentrations in the plasma of a divergent heart failure patient population. In heart failure, the heart is not able to pump sufficient amounts of blood to meet the tissues needs. Recently it was postulated that stressed cardiomyocytes of the failing heart can initiate apoptosis without progressing towards full execution. These insights indicate towards mechanisms that protect stressed PS expressing cardiomyocytes. Because anxA5 binds PS with high affinity, inhibits phagocytosis of PS expressing cells, delays apoptosis and promotes the repair of injured cellular membranes, we argued that anxA5 may contribute to dampening adverse effects of PS on the surface of stressed cardiomyocytes. Therefore we measured the anxA5 plasma levels in heart failure patients. In these measurements we clearly showed that plasma anxA5 levels are significantly elevated in patients with heart failure as compared with healthy controls. In addition we showed that the patients with the highest anxA5 levels died first with no association with established clinical and biochemical heart failure measures. Following from these observations, we would like to propose to add anxA5 as a novel biomarker on top of already established biomarkers in heart failure. An adequate early diagnosis is essential because at this moment no sufficient therapeutics are available to treat heart failure patients in a late stadium.

In chapter 3 we tried to get more insight into the physiological meaning of these elevated anxA5 levels. Therefore, we induced heart failure in mice that lack the anxA5 gene (anxA5 knock-out mice) and in mice that carry the anxA5 gene (anxA5 Wild Type mice). In these experiments we found that the anxA5 knock-out mice develop a more severe diastolic dysfunction as compared to the anxA5 Wild Type mice. This form of dysfunction is very often seen in patients but no animal model is available that resembles this diastolic dysfunction phenotype at this time. Hence, the anxA5 knock out mouse delivers a novel platform to test novel therapeutic strategies that bear potential for treatment of heart failure suffering from diastolic dysfunction.

In chapter 4 we tried to transform anxA5 from a molecular imaging tool into a therapeutic agent in diseases where the clean-up process is diminished. An inefficient phagocytosis of apoptotic cells will lead to the bursting of the apoptotic cells whereby intracellular components of the cell will leak into the extracellular environment. This will finally result into the startup of the inflammation cascade. We reasoned that targeting PS to ligate the apoptotic cell with phagocytes could be a viable strategy to treat inflammation.

AnxA5 itself inhibits phagocytosis but by site-directed mutagenesis we introduced an RGD-motif in the anxA5 molecule, which is known to ligate with receptors expressed on

phagocytes. We showed in chapter 4 that the introduction of the RGD-motif transforms anxA5 from an inhibitor into a stimulator of the phagocytosis of apoptotic cells.

In chapter 5 we evaluated these pro-phagocytotic properties of RGD-anxA5 in atherosclerosis, a very well known inflammatory disease in which an inefficient removal of apoptotic cells leads to the destabilization of atherosclerotic lesions. In my thesis we evaluated the influence of RGD-anxA5 on the initial development of atherosclerotic lesions. Herein we found that the atherosclerotic lesion formation is fully inhibited in the RGD-anxA5 treated group. We reasoned that enhancing phagocytosis of apoptotic cells is not the only explanation for the complete inhibition of lesion formation. In the search for additional mechanisms we found that RGD-anxA5 is also able to inhibit monocyte infiltration. Monocyte infiltration plays an important role in the initial inflammation cascade in the vascular wall that cause the atherosclerotic lesion initiation. RGD-anxA5, hence, represents a novel promising therapeutic compound combining multiple biological activities to treat vascular inflammation.

SAMENVATTING

Multicellulaire organismen reguleren hun cel aantal door een proces van cel aanmaak, proliferatie, aan de ene kant en cel afbraak, celdood, aan de andere kant. Vanuit biologisch oogpunt bestaan er voor cellen hoofdzakelijk twee manieren om dood te gaan: een gereguleerde vorm (apoptose) en een niet-gereguleerde vorm (necrose).

In 1992 werd een cel ontdekt die tijdens het apoptotische celdoodprogramma fosfatidylserine (PS) aan zijn cel oppervlak kan tentoonstellen. Later werd aangetoond dat in principe alle cellen de moleculaire machinerie bezitten om PS te exposeren tijdens het apoptotische celdoodprogramma. PS is een negatief geladen fosfolipide dat in gezonde cellen hoofdzakelijk aan de binnenzijde van de cel membraan gelokaliseerd is.

Structuur/functie-analyse en bindingsproeven toonden aan dat PS aan de buitenzijde van de plasmamembraan als een 'eet mij'-signaal fungeert voor de 'opruimers van het organisme' (fagocyten). Deze bezitten specifieke receptoren voor PS welke na binding met PS het opruimproces (fagocytose) activeren. De PS-receptoren zijn tot op heden nog niet geïdentificeerd maar er zijn wel eiwitten bekend die met hoge affiniteit kunnen binden aan PS. Eén van deze eiwitten is annexine A5 (anxA5), dat door mijn promotor Prof. dr. Chris Reutelingsperger in Maastricht voor het eerst gekarakteriseerd werd. Vanwege deze biologische activiteit is anxA5 uitermate geschikt om celdood *in vitro* (in een proefbuis), *in vivo* (in een organisme) en in patiënten te meten. Gedurende de laatste decenia werd hoofdzakelijk onderzoek verricht naar deze 'imaging'-eigenschappen van anxA5. In dit proefschrift is de focus echter niet gericht naar de verbetering van deze moleculaire imaging eigenschappen van anxA5 maar enerzijds op de ontwikkeling van anxA5 als biomarker in hartfalen en anderzijds op de ontwikkeling van anxA5 varianten die als therapeuticum gebruikt kunnen worden in weefsels waar de verhouding tussen apoptose en fagocytose verstoort is.

In hoofdstuk 2 hebben we de hoeveelheid anxA5 in het plasma van een uitgebreide hartfaalpatiënten populatie gemeten. Bij hartfalen is het hart niet meer in staat om voldoende bloed rond te pompen om aan de behoeften van de weefsels te voldoen.

Hierbij stelden we verhoogde anxA5 concentraties vast in het plasma van deze hartfaalpatiënten in vergelijking met gezonde personen. Verder toonden we aan dat de patiënten met de hoogste anxA5 plasma levels het eerste stierven terwijl geen enkele andere conventionele biomarker hetzelfde patroon laat zien. Hieruit volgt dat het toevoegen van anxA5 aan het pellet van huidige biomarkers in de toekomst kan leiden tot een betere diagnose bij deze hartfaalpatiënten. Een adequate vroegtijdige diagnose is essentieel aangezien er op dit moment geen afdoende therapeutica voorhanden zijn om hartfaalpatiënten in een laattijdig stadium te behandelen.

In hoofdstuk 3 hebben we getracht om meer inzicht te verkrijgen in de fysiologische betekenis van deze verhoogde anxA5 plasma levels bij deze hartfaalpatiënten. Om deze invloed te toetsen, hebben we hartfalen geïnduceerd bij muizen die het anxA5 gen missen (anxA5 knock-out) en bij muizen die het anxA5 gen bezitten (anxA5 wilde type muizen). Uit deze experimenten blijkt dat de anxA5 knock-out muizen een verergerde vorm van hartfalen vertonen. Deze vorm van hartfalen is nooit eerder beschreven in een dierenmodel. Dit nieuwe dierenmodel biedt de mogelijkheid om zeer snel verschillende therapeutica te testen.

In hoofdstuk 4 hebben we getracht om anxA5 om te vormen in een therapeutisch molecule ter behandeling van ziekten met een verlaagde opruiming van apoptotische cellen. Hiervoor hebben we in het anxA5 molecule een motief ingebracht dat bekend is om te liggen met receptoren aanwezig op fagocyten. Met dit gemodificeerde anxA5 molecule hebben we getracht om een brug te vormen tussen fagocyt en de apoptotische cel. Met succes slaagden we erin om het anxA5 molecule om te vormen van een remmer naar een stimulator van de fagocytose.

In hoofdstuk 5 hebben we de therapeutische eigenschappen van dit gemodificeerde anxA5 molecule getoetst in een muizenmodel van aderverkalking (atherosclerose). Atherosclerose is een zeer bekend voorbeeld van een ontstekingsziekte waarbij een inefficiënte fagocytose van apoptotische cellen leidt tot het onstabiel worden van de atherosclerotische plaque. In hoofdstuk 5 hebben we ons enkel gefocussed op de initiële plaque ontwikkeling. Analyse van de gevormde plaques onthulde een volledige inhibitie van de atherosclerotische plaque formatie. Deze bevindingen maken van het anxA5 molecule een nieuw veelbelovend therapeuticum ter behandeling van vasculaire inflammatie.